

550,998
Rec'd PCT/PTO 26 SEP 2005
10550998

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際特許願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 10 月 7 日 (07.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/084912 A1

(51) 国際特許分類: A61K 31/70, C07H
5/06, 7/033, C08B 37/08, A61P 25/00

〒1030023 東京都中央区日本橋本町二丁目 1 番 5 号
Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/004240

(72) 発明者; および

(22) 国際出願日: 2004 年 3 月 25 日 (25.03.2004)

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 加藤 忠彦
(KATO, Tadahiko) [JP/JP]; 〒1900182 東京都西多摩
郡日の出町平井 2 5 1 2 - 3 2 Tokyo (JP). 浅利 晃
(ASARI, Akira) [JP/JP]; 〒3580053 埼玉県入間市大字
仏子 7 6 9 番地 2 ダイアパレス 4 1 0 Saitama (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-083831 2003 年 3 月 25 日 (25.03.2003) JP

(74) 代理人: 川口 嘉之, 外(KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋 3 丁目 4 番
1 0 号 アクロポリス 2 1 ビル 6 階 Tokyo (JP).

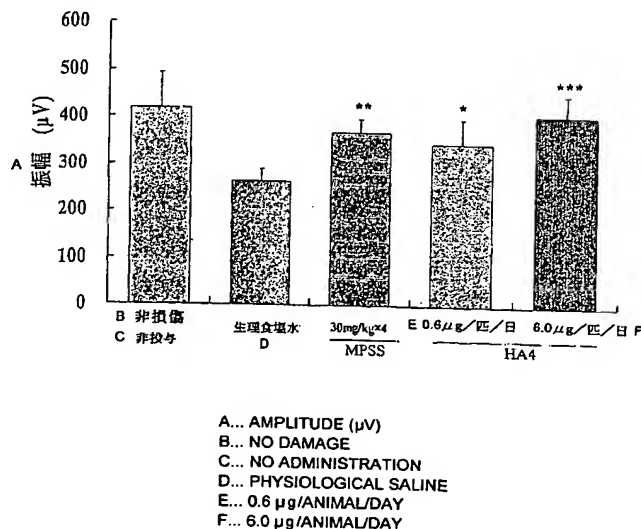
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 生化学工
業株式会社 (SEIKAGAKU CORPORATION) [JP/JP];

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,

[続葉有]

(54) Title: REMEDY FOR NERVE DAMAGE

(54) 発明の名称: 神経障害処置剤



(57) Abstract: It is intended to provide a remedy for nerve damage caused by spinal injury, nerve trauma or the like which contains, as the active ingredient, a low-molecular weight saccharide at least having glucuronic acid and/or N-acetylglucosamine as the constituting sugar(s) or a pharmaceutically acceptable salt thereof. Preferably, a remedy for nerve damage which contains, as the active ingredient, a low-molecular weight hyaluronic acid (still preferably hyaluronic acid disaccharide to hyaluronic acid 2500-saccharide, still preferably hyaluronic acid disaccharide to hyaluronic acid 50-saccharide, particularly preferably hyaluronic acid tetrasaccharide) or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

(57) 要約: グルクロン酸及び/若しくはN-アセチルグルコサミンを少なくとも構成糖とする低分子量の糖又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする、脊髄損傷又は神経の外傷などによる神経障害の処置剤を提供する。好ましくは低分子量ヒアルロン酸、より好ましくはヒアルロン酸2糖~ヒアルロン酸2500糖、さらに好ましくはヒアルロン酸2糖~ヒアルロン酸50糖、特に好ましくはヒアルロン酸4糖、又はこれらの薬学的に許容される塩を有効成分とする神経障害処置剤を提供する。

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/084912 A1



DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

神経障害処置剤

技術分野

本発明は、グルクロン酸及び／若しくはN-アセチルグルコサミンを少なくとも構成糖とする低分子量の糖（特に、低分子量ヒアルロン酸）又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする、神経障害処置剤に関する。

背景技術

特開平11-140103号公報には、HA（ヒアルロン酸）またはその薬学的に許容される塩を含有する水性溶液からなる脊髄灌流液が開示されており、この灌流液は脊髄損傷における脊髄灌流療法に用いることができる旨が記載されている。そして、HAの重量平均分子量の例示として50万～400万のものが記載されている。

しかし、GlcA（グルクロン酸）及び／若しくはGlcNAc（N-アセチルグルコサミン）を少なくとも構成糖とする低分子量の糖（特に低分子量HA）を用いることについては開示も示唆もなく、従って、このような低分子量の糖がさらに優れた効果を奏することについての開示も示唆もない。

発明の開示

まず、本明細書において用いる略号を説明する。

GlcNAc : N-アセチルグルコサミン

GlcA : グルクロン酸

HA : ヒアルロン酸

DMSO : ジメチルスルホキシド

PBS : リン酸緩衝生理食塩液

SCEP : 脊髄誘発電位

本発明は、G 1 c A及び／若しくはG 1 c N A cを少なくとも構成糖とする低分子量の糖（特に低分子量HA）又はその薬学的に許容される塩を有効成分とし、安全で有用な神経障害処置剤を提供することを目的とする。

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、G 1 c A及び／若しくはG 1 c N A cを少なくとも構成糖とする低分子量の糖（特に低分子量HA）が、神経障害、特に脊髄損傷に対して極めて優れた効果を発揮することを見出し、これにより上記課題を解決しうる神経障害処置剤を提供して、本発明に至った。

すなわち本発明は、G 1 c A及び／若しくはG 1 c N A cを少なくとも構成糖とする低分子量の糖又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする、神経障害処置剤（以下、本発明処置剤という）を提供する。

ここにいう「G 1 c A及び／若しくはG 1 c N A cを少なくとも構成糖とする低分子量の糖」は、低分子量HAであるものが好ましい。また「低分子量HA」はHA 2糖～HA 2500糖であるものが好ましく、HA 2糖～HA 50糖であるものがより好ましく、HA 4糖であるものが特に好ましい。

また、本発明処置剤は、脊髄損傷又は神経の外傷に対する処置剤であることが好ましい。

本発明はまた、G 1 c A及び／若しくはG 1 c N A cを少なくとも構成糖とする低分子量の糖又はその薬学的に許容される塩の有効量を神経障害に罹患した動物（特にヒトを含む哺乳動物）に投与することを特徴とする、神経障害の処置方法を提供する。

本発明はさらに、神経障害処置剤を製造するためのG 1 c A及び／若しくはG 1 c N A cを少なくとも構成糖とする低分子量の糖又はその薬学的に許容される塩の使用を提供する。

図面の簡単な説明

図1は薬効薬理試験方法の模式図を示す。

図2は軽度損傷モデル（A）と強度損傷モデル（I）（B）における損傷の程度を示す図である（写真）。

図3はHA 4を投与した場合の、軽度損傷モデルにおけるSCEPの測定結果を示す

図である。図中の「*」は、生食群に対して $p<0.05$ で有意差があることを示す（Dunnett'sの多重比較検定）。

図4はHA4を投与した場合の、強度損傷モデル（I）におけるSCEPの測定結果を示す図である。MPSSはコハク酸メチルプレドニゾロンナトリウム投与群を示す。また、図中の「*」、「**」、「***」は、生食群に対して、それぞれ、 $p<0.05$ 、 $p<0.01$ 、 $p<0.0001$ で有意差があることを示す（Dunnett'sの多重比較検定）。

図5は強度損傷モデル（II）におけるSCEPの測定結果を示す図である。図中の「*」は、生食群に対して $p<0.05$ で有意差があることを示す（Tukeyの多重比較検定）。

図6は軽度損傷モデルのPBS投与群における損傷部位領域の観察結果を示す図である（写真）。bの矢印は脱落したミエリンを示す。

図7は軽度損傷モデルのHA4を投与した群における損傷部位領域の観察結果を示す図である（写真）。楕円は損傷部位を示す。

図8は損傷領域の測定方法の模式図である。

図9は軽度損傷モデルにHA4を投与した場合の、「損傷エリア」の測定結果を示す図である。

図10は白質～灰白質の横断部分の観察結果を示す図である（写真）。（A）は生食群を、（B）はHA4群を示す。また、矢印は白質～灰白質を横断する軸索を示す。

図11は軽度損傷モデルにおける白質～灰白質を横断（交差）する軸索の本数の測定結果を示す図である。

図12は強度損傷モデル（II）における脊髄損傷7日後の後肢スリップ数の測定結果を示す図である。（A）が平均台横断、（B）が金網横断の結果を示す。図中の「***」は、生食群に対して $p<0.0001$ で有意差があることを示す（Tukeyの多重比較検定）。

図13は強度損傷モデル（II）における脊髄損傷後、7日間の後肢運動機能検査の測定結果（BBBスケール）を示す図である。図中の「***」は、生食群に対して $p<0.0001$ で有意差があることを示す（Tukeyの多重比較検定）。

発明を実施するための最良の形態

本発明を以下で詳細に説明する。

< 1 > 本発明処置剤の有効成分

(1) G1cA及び／若しくはG1cNAcを少なくとも構成糖とする低分子量の糖又はその薬学的に許容される塩

本明細書において「G1cA及び／若しくはG1cNAcを少なくとも構成糖とする低分子量の糖」には、「G1cAを少なくとも構成糖とする低分子量の糖」、「G1cNAcを少なくとも構成糖とする低分子量の糖」及び「G1cAとG1cNAcとを少なくとも構成糖とする低分子量の糖」が含有される。そして「G1cAを少なくとも構成糖とする低分子量の糖」には単糖としての「G1cA」も包含され、「G1cNAcを少なくとも構成糖とする低分子量の糖」には単糖としての「G1cNAc」も包含される。

G1cAはD-グルクロン酸であることが好ましく、G1cNAcはN-アセチル-D-グルコサミンであることが好ましい。

このような「G1cA及び／若しくはG1cNAcを少なくとも構成糖とする低分子量の糖」としては低分子量HAが好ましい。また、このような低分子量の糖としては硫酸基を有しないものが好ましい。

本明細書において「低分子量HA」とは、HAの構成二糖組成と同様の組成からなる低分子量の糖鎖である。具体的は、G1cAとG1cNAcとが交互にグリコシド結合している低分子量の糖鎖を意味する。

そしてこのような低分子量の糖鎖である限りにおいて、当該糖鎖の非還元末端がG1cAであるものの他、非還元末端がG1cNAcであるものも、ここでいう「低分子量HA」に包含される。なかでも、非還元末端に位置する単糖がG1cAであるものが好ましい。また、その還元末端に位置する単糖はG1cNAcであるものが好ましい。

非還元末端に位置する単糖は、飽和糖(単糖中の炭素・炭素間の結合に二重結合を含まないもの)でも不飽和糖(単糖中の炭素・炭素間の結合に二重結合を含むもの)でもよい。なかでも非還元末端に位置する単糖が飽和糖であるものが好ましい。

本明細書において「低分子量」とは、当技術分野(特にグリコサミノグリカンに関する技術分野)における当業者において、低分子量であると認識される程度の分子量を意味する。少なくとも、重量平均分子量が1000kDを超えるものについては、当技術

分野において「低分子量」であると認識されるものではない。

「低分子量HA」としてはHA 2糖～HA 2500糖が好ましく、HA 2糖～HA 2000糖がより好ましく、HA 2糖～HA 1500糖がさらに好ましく、HA 2糖～HA 1000糖がさらにより好ましく、HA 2糖～HA 500糖が特に好ましく、HA 2糖～HA 250糖が非常に好ましく、HA 2糖～HA 100糖が極めて好ましい。そのなかでもHAオリゴ糖が極めて好ましい。

ここで「オリゴ糖」とは、当技術分野における当業者において、オリゴ糖であると認識される程度の糖鎖を意味する。例えば「HAオリゴ糖」としては、HA 2糖～HA 500糖が例示されるが、HA 2糖～HA 30糖が好ましく、HA 2糖～HA 20糖がより好ましく、HA 2糖～HA 10糖がさらに好ましく、HA 4糖がさらにより好ましい。

なお、低分子量HAは種々の分子量の糖の混合物であってもよい。したがって、前記HA 4糖とは、HA 4糖のみからなるものだけでなく、HA 4糖を主成分として含むHAオリゴ糖の混合物も包含される。ここでいうHAオリゴ糖には前記例示のHAオリゴ糖の混合物が包含される。

GlcAとGlcNAcとの間におけるグリコシド結合は β 1 \rightarrow 3結合であることが好ましく、GlcNAcとGlcAとの間におけるグリコシド結合は β 1 \rightarrow 4結合であることが好ましい。

本発明処置剤において用いることができる「GlcA及び／若しくはGlcNAcを少なくとも構成糖とする低分子量の糖又はその薬学的に許容される塩」の由来は特に限定されない。例えば、このような糖鎖として低分子量HAを用いる場合には、鶏冠、臍帯、HAを産生する微生物等から分離、精製されたHAを分解する方法（例えば酵素分解法、化学分解法、加熱処理法、超音波処理法等）や、合成（例えば化学合成法や酵素合成法）によって製造できる。

酵素分解法としては、ヒアルロニダーゼ（辜丸由来）、ヒアルロニダーゼ（*Streptomyces*由来）、ヒアルロニダーゼSD、コンドロイチナーゼACI、コンドロイチナーゼACII、コンドロイチナーゼACIII、コンドロイチナーゼABCなどの、HAを分解できる酵素をHAに作用させる方法が挙げられる（新生化学実験講座「糖質II—プロテオグリカンとグリコサミノグリカン—」p244-248、1991年発行、東京化学同人、又はGlycobiolo

gy、12、p421-426、2002年、参照)。低分子量HAを得るためには、HAを分解できる酵素としてHA加水分解酵素を用いることが好ましい。

化学分解法としては、アルカリ分解法やDMSO法等が挙げられる。アルカリ分解法は、例えばHAの溶液に1N程度の水酸化ナトリウム等の塩基を加え、数時間加温して低分子化させた後、塩酸等の酸を加えて中和することにより行うことができる。DMSO法としてはNagasawaらの方法 (Carbohydr. Res., 141, p99-110, 1985) が挙げられる。超音波処理法としては Biochem., 33, p6503-6507 (1994)等に記載された方法が挙げられる。

合成による製造方法としては Glycoconjugate J., p453-439 (1993)、国際公開W093/20827等に記載された方法が挙げられる。

以上のような方法によって低分子量HAを含む画分が得られるが、この画分は通常の糖鎖の分離、精製の手法によってさらに精製することができる。例えば、吸着クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過法、ゲル浸透クロマトグラフィー、濾紙電気泳動法、濾紙クロマトグラフィー、塩析、有機溶媒による分画、あるいはこれらの組み合わせ等の操作によって行うことができる (Glycobiology、12、p421-426、2002年) が、これらに限定されるものではない。

このような方法によって画分中の低分子量HAの含有率を高めることができ、また医薬として混入が許されない物質を排除することもできる。

このようにして得られる低分子量HAは、高純度に精製され、医薬として混入が許されない物質を実質的に含まないものが好ましい。

GlcA及び/若しくはGlcNAcを少なくとも構成糖とする低分子量の糖の薬学的に許容される塩としては、例えば、アルカリ金属塩 (ナトリウム塩、リチウム塩、カリウム塩等)、アルカリ土類金属塩、アンモニウム塩等の無機塩基との塩、またはジェタノールアミン塩、シクロヘキシルアミン塩、アミノ酸塩等の有機塩基との塩のうち、薬学的に許容される塩を用いることができる。なかでもナトリウム塩であることが好ましい。

上記のようなGlcA及び/若しくはGlcNAcを少なくとも構成糖とする低分子

量の糖又はその薬学的に許容される塩を用いることにより、極めて優れた薬理作用を有する神経障害処置剤とすることができる。

なお、本発明処置剤に使用されるG l c A及び／若しくはG l c N A cを少なくとも構成糖とする低分子量の糖又はその薬学的に許容される塩中のエンドトキシン濃度は、本発明処置剤を液剤とした場合において0.3 E U / m L以下、液剤以外の剤とした場合においては前記液剤のエンドトキシン含量に相当する量以下であることが好ましい。本発明処置剤中のエンドトキシン濃度は、当業者に周知慣用のエンドトキシンの測定法を用いて測定することができるが、カプトガニ・アメボサイト・ライセート成分を用いるリムルス試験法が好ましい。なおE U（エンドトキシン単位）は、日本工業規格生化学試薬通則（J I S K 8 0 0 8）に従って測定・算出できる。また、鉄含量は20 p p m以下であることが好ましい。

（2）本発明処置剤の剤型等

本発明処置剤の投与方法は、本発明処置剤による神経障害に対する作用が発揮される限りにおいて特に限定されないが、例えば注射（硬膜内、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、腹腔内等）、経鼻、経口、経皮、吸入等の投与経路が挙げられる。その投与方法は、注射による特定部位への直接投与や、点滴による投与など、適用される疾患や部位等によって適宜選択される。硬膜内等に投与する場合には、植込み型の薬剤注入ポンプを体内に植え込んで、持続投与してもよい。

このような投与経路や投与方法に応じて、前記の低分子量の糖又はその薬学的に許容される塩を適宜製剤化して、本発明処置剤とすることができる。剤型としては、注射剤（溶液、懸濁液、乳濁液、用時溶解用固形剤等）、錠剤、カプセル剤、液剤、顆粒剤、散剤、リポ化剤、軟膏剤、硬膏剤、ローション剤、パスタ剤、貼付剤、ゲル剤、坐剤、外用散剤、スプレー剤、吸入散剤等が挙げられるが、注射剤等の液剤の形態とすることが好ましい。

液剤は、例えば適当な水性溶媒あるいは医薬品に慣用される溶媒に、G l c A及び／若しくはG l c N A cを少なくとも構成糖とする低分子量の糖又はその薬学的に許容される塩を溶解させることにより製造することができる。このような溶媒としては、蒸留

水、緩衝液、生理食塩水、水混和性有機溶媒を含む水等が例示される。

本発明処置剤を注射剤として提供する場合、その形態は、溶液、凍結物、または凍結乾燥物のいずれであってもよい。これをアンプル、バイアル、注射用シリンジ等の適当な容器に充填・密封し、そのまま流通させあるいは保存して、注射剤として投与することができる。

本発明処置剤の製剤化には公知の方法を用いることができる。また製剤化にあたり、前記の糖又はその薬学的に許容される塩に悪影響を与えず、かつ本発明の効果に影響を与えない限りにおいて、他の医薬活性成分（例えば抗炎症剤、鎮痛剤、ビタミン剤、抗菌剤、成長因子、接着因子など）や、慣用の安定化剤、乳化剤、浸透圧調整剤、pH調整剤、緩衝剤、等張化剤、保存剤、無痛化剤、着色剤、賦形剤、結合剤、滑沢剤、崩壊剤等、通常医薬に用いられる成分を使用できる。

本発明処置剤は、G 1 c A及び／若しくはG 1 c N A cを少なくとも構成糖とする低分子量の糖又はその薬学的に許容される塩を有効成分とすることから、少なくともG 1 c A及び／若しくはG 1 c N A cを少なくとも構成糖とする低分子量の糖又はその薬学的に許容される塩が含有されていればよく、他の分子サイズや他の種類の糖を含んでも差し支えない。

(3) 本発明処置剤の投与対象等

本発明処置剤は、神経障害の処置に資せんとするものであるから、神経障害に対する処置が望まれる状況にある動物、すなわち神経障害に罹患した動物に対して適用することができる。

「神経障害に対する処置が望まれる状況」は、特に限定されるものではないが、例えば脊髄損傷や頭部外傷などの神経の外傷、脳性（小児）麻痺、脊髄血管障害、頸部脊椎症、老人性痴呆、アルツハイマー病、パーキンソン病、脊髄小脳変性症（遺伝性痙攣性対麻痺）等が例示される。なかでも脊髄損傷や神経の外傷に対して適用されることが好ましく、脊髄損傷に対して適用されることがより好ましい。脊髄損傷としては、外傷性脊髄損傷、脊椎変性疾患（脊椎症等）、脊椎炎症性疾患（脊椎炎、慢性関節リウマチ等）、腫瘍（脊髄腫瘍、脊椎腫瘍等）、血管性疾患（脊髄出血、脳卒中、髄外血管障害によ

る脊髄麻痺等)、脊髄炎(クモ膜炎、ウイルス性脊髄炎、細菌性脊髄炎等)、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症等が挙げられる。特に外傷性脊髄損傷に有効である。

すなわち、本発明処置剤は、脊髄損傷や神経の外傷に対する処置剤であることが好ましく、脊髄損傷に対する処置剤であることがより好ましく、外傷性脊髄損傷に対する処置剤であることが特に好ましい。

本発明処置剤を動物に投与する場合、これが投与される動物は、脊椎動物、特にヒトを含む哺乳動物が好ましい。本発明処置剤による「処置」の目的も特に限定されないが、神経障害の進行抑制(悪化防止)、症状の改善、治療等を目的とすることができる。

本発明処置剤におけるGlcA及び/若しくはGlcNAcを少なくとも構成糖とする低分子量の糖又はその薬学的に許容される塩の配合量、1回あたりの投与量、投与間隔等は、本発明処置剤の投与方法、投与形態、使用目的等、患者の具体的症状、年齢、性別、体重等に応じて個別に決定されるべき事項であり、特に限定されないが、GlcA及び/若しくはGlcNAcを少なくとも構成糖とする低分子量の糖又はその薬学的に許容される塩の臨床量として成人1人1回当たり100 μ g~1000mgが例示される。

また本発明処置剤の投与間隔は、1日1回程度でもよく、1日2~3回に分けて投与することもできる。また、前記のような植込み型の薬剤注入ポンプ等を用いて持続的に投与することもできる。

なお本発明は、本発明処置剤だけでなく、神経障害に対する処置が望まれる適用対象(動物)にGlcA及び/若しくはGlcNAcを少なくとも構成糖とする低分子量の糖又はその薬学的に許容される塩を投与することを特徴とする、神経障害の処置方法も包含する。

実施例

以下に、本発明の実施例を具体的に説明する。しかしながら、これらにより本発明の技術的範囲が限定されるものではない。

<材料等>

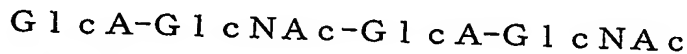
まず、本実施例において用いた物質等を説明する。

試薬等

GlcA及び／若しくはGlcNAcを少なくとも構成糖とする低分子量の糖として、低分子量HAを用いた。

低分子量HAは、生化学工業株式会社から提供されたものを用いた。この低分子量HAは、以下の構造を有し、以下の性質を有するものであった（カッコ内は、本実施例において用いる略号を示す。下記式中、「-」はグリコシド結合を表す。）

・HA飽和4糖（以下、「HA4」という。）



HA4は、Nagasawaらの方法(Carbohydr. Res., 141, p99-110, 1985)に準じて、塩酸(HCl)を含有するDMSOでHAを処理して得られた分解産物を、陰イオン交換クロマトグラフィーでサイズごとに分画することによって得た。

HA4は、以下の薬効薬理試験に応じて所定の濃度となるようにPBSに溶解して用いた。PBSに溶解した後のエンドトキシン濃度はいずれも0.3 EU/mL以下であり、また鉄含量はいずれも20 ppm以下であった。

<薬効薬理試験> 脊髄損傷に対するHA4の作用

(1) 脊髄損傷モデルの作製およびHA4の投与（図1、2）

本試験の模式図を図1に示す。

動物としてWistarラット（SPF、雄）を用い、ペントバルビタール（50mg/kg体重）の麻酔下に、頸部から臀部にかけて電気バリカンで剪毛し、70% エタノールおよびイソジン（明治製菓株式会社製）で清拭した。背部皮膚を切開し、T5からT10胸椎を露出させた後、第六胸椎（T6胸椎）を半椎弓切除し、硬膜に小切開を加え、キシロカイン（アストラゼネカ製）で局所麻酔した後、T6の位置でスパーテル（先端を0.3mmに加工したもの）を背側から腹部椎体に届くまで刺入して10秒間保持することによって脊髄を坐滅させたもの（軽度損傷モデル）と、ピンセット（先端を0.3mmに加工したもの）をその先端が腹部椎体に届くまで刺入して両側から10秒間はさむことによって脊髄を坐滅させたもの（強度損傷モデル）の2種類のモデルを作製した。人工呼吸器（Respirat

or) は脊髄誘発電位測定時のみ使用した。1. 0～2. 0%ハロタン麻酔下で気管に挿管後、筋弛緩剤で非動化した。それぞれのモデルの損傷の程度を図2に示す。

損傷後、直ちにHA 4 (6 μ l) をマイクロシリンジ (25 μ l ; 株式会社伊藤製作所製) を用いて硬膜内に投与した。その後、HA 4 を充填した浸透圧ポンプ (モデル 1002, Alzet製) に接続したチューブの先端 (OD : 0.3mm) を損傷部頭部側の硬膜下に留置し、HA 4 を7日間持続投与した。また、陽性対照としてコハク酸メチルプレドニゾロンナトリウム (MPSS、ファルマシア社製) 30mg/kgを、損傷後5分目、2時間目、4時間目および6時間目に尾静脈内投与した。損傷部と周囲組織の隔離のために、ゼラチンスポンジ (Gelform ; ファルマシア社製) を置き、創部を縫合し、飼育ケージに戻した。

本試験の群構成は以下の通りである。

1. 軽度損傷モデル :

- (1) 無損傷・無処理群
- (2) PBS投与群 (生食群)
- (3) HA 4 60 μ g/匹/日投与群

2. 強度損傷モデル (I) :

- (1) 無損傷・無処理群
- (2) PBS投与群 (生食群)
- (3) メチルプレドニゾン (MPSS) 30mg/kg体重/日 x 4回投与群
- (4) HA 4 0.6 μ g/匹/日投与群
- (5) HA 4 6.0 μ g/匹/日投与群

3. 強度損傷モデル (II) :

- (1) 硬膜に小切開を行った偽手術群 (Sham)
- (2) PBS投与群 (生食群)
- (3) HA 4 6.0 μ g/匹/日投与群

(2) 一般状態の評価

試験物質を投与した後、一般状態の観察を行った。その結果、PBS投与群では投与

7日目においても歩行困難が観察されたが、HA 4投与群ではほぼ正常と同様の歩行が観察された。

(3) HA 4の脊髄誘発電位 (SCEP) に与える影響

脊髄誘発電位は脊髄損傷後7日目に測定した。ハロセン麻酔(導入時4.0%、維持時1.0%)下で気管内挿管し、筋弛緩剤で非動化し、腹臥位に頭部を固定して人工呼吸器により維持した。第2/3頸椎間および第13胸椎/第1腰椎間からカテーテル電極を挿入し、筋電計(Powerpoint; ダンテック社製)を用いて、最大上刺激(刺激頻度: 1 Hz、持続期間: 0.05ミリ秒)し、脊髄誘発電位(SCEP)を測定し、「平均値±SD」を算出した。得られた電位の評価は、第1電位の振幅を指標とした。軽度損傷モデルにおける結果を図3に、強度損傷モデル(I)における結果を図4にそれぞれ示す。図中の「*」は、生食群に対して $p<0.05$ で有意差があることを示す(Dunnett'sの多重比較検定)。

その結果、軽度損傷モデルにおいては、PBS投与群と比較して、HA 4 60 μ g/匹/日投与群において有意なSCEP振幅の低下抑制あるいは回復($p<0.05$)が認められた。このレベルは、正常レベル(無損傷・無処理群)と同等であった(図3)。強度損傷モデルでは、PBS投与群と比較して、HA 4 0.6 μ g/匹/日および6 μ g/匹/日投与群でいずれも有意なSCEP振幅の低下抑制あるいは回復がみられ(それぞれ、 $p<0.05$ 及び $p<0.001$; 正常レベルと同等)、6 μ g/匹/日投与群ではMPSSより強い効果が認められた(図4)。また、強度損傷モデル(II)においても上記と同様にSCEPの測定を行った。結果を図5に示す。その結果、生食投与群と比較して、HA 4 6.0 μ g/匹/日投与群で有意なSCEP振幅の回復($p<0.05$)が認められた(図5)。なお、図中の「*」は、生食群に対して $p<0.05$ で有意差があることを示す(Tukeyの多重比較検定)。

(4) 病理組織学的見地からの評価(軽度損傷モデル)

損傷部位を中心として約2cm長の脊髄を中性緩衝ホルマリンで固定した後、パラフィンに包埋した。背側から冠状面(coronal)な面の連続切片を作製し、クリューラバレーラ染色(ミエリンが青に染まる)を行った。中心管を含む位置の組織標本にて、(a)損傷部位

領域および(b)白質-灰白質を横断する軸索(第6胸髄で入出する軸索)を観察した。PBS投与群における結果を図6に、HA4を投与した群における結果を図7に示す。

その結果、PBS投与群において、組織傷害領域は、損傷を加えた部位(損傷部位)のみならず、損傷部位から1cm以上も離れた白質においても浮腫、ミエリンの脱落が認められた(図6)。この白質における組織傷害は、連続的あるいは、飛び石状を呈していた(図6)。HA4を投与した群では、組織傷害は損傷部位近傍に限定されており、白質における浮腫・ミエリンの脱落はまれにしか認められなかった(図7)。

図8に示す通り、冠状面(coronal)の中心管を含む面において、両側及び頭部側(rostral)、尾側(caudal)の遠位端の損傷部位4点を結ぶ四角形(図8中の太線内)を「損傷エリア」として損傷された広さを測定した。その結果、HA4を投与した群では、PBS投与群に比して有意な低値を示した(図9)。

また、白質～灰白質を横断(交差)する軸索の本数(損傷部位のrostral/caudal方向5mmの範囲)を測定したところ、その軸索数は、生食群に比べHA4投与群において有意に多数であった(図10、図11)。

(5) 行動学的見地からの評価(強度損傷モデル(II))

動物は脊髄損傷作製前から平均台(3cm×100cm)および金網(20cm×100cm)の横断検査のために、トレーニングを5～7日間実施した。トレーニング終了後、各動物について上記(1)～3と同様にして強度脊髄損傷モデル(II)を作製し、その後7日間PBS又はHA4を腹腔内持続投与した後に、両障害を動物当たり4回それぞれ横断させ、後肢スリップ数を記録し、その平均値を用いて評価した(図12)。なお、硬膜に小切開を行った偽手術群(Sham)についても後肢スリップ数を測定した。

また、脊髄損傷後、PBS又はHA4投与群及び偽手術群について7日間毎日、後肢運動機能検査を行った。Bassoらの方法に準じ、Basso-Beeattie-Bresnahan(BBB)スケールを用いて、2人の試験官がブラインドで独立して評価を行い、その平均点を最終評点とした(図13)。

平均台・金網横断において、両障害からの後肢スリップ数の有意な低値($P<0.0001$)がみられ(図12)、BBBスケールを用いた後肢運動機能検査においても、生食投与群と比

較して、脊髄損傷後1から7日を通して、HA 4 6 μ g/day 投与で有意な後肢運動機能の回復($P<0.0001$)が認められた(図13)。なお、図中の「***」は、生食群に対して $p<0.0001$ で有意差があることを示す(Tukeyの多重比較検定)。

以上の結果から、HA 4 投与による脊髄誘発電位の低下の抑制あるいは回復が示された。このことは、HA 4 が脊髄損傷による神経機能の低下抑制あるいは回復をもたらす作用を有していることを示している。事実、HA 4 を投与した群では後肢運動機能の有意な回復が認められている。

病理組織学的評価においても、HA 4 投与群では組織傷害が抑制されており、HA 4 の神経機能への作用が、この組織傷害抑制と結びついていることが示唆される。特にHA 4 によるミエリンの脱落(2次損傷における脱髄)の抑制および軸索数の減少(損傷による神経細胞あるいはオリゴデンドロサイトのアポトーシスによって消失したものと考えられる)の抑制は、HA 4 による神経機能の低下抑制に深く関与していることを示している。

また、動物を用いた上記試験の結果によって、本発明処置剤の安全性が裏付けられた。

以上の結果から、「GlcA及び/若しくはGlcNAcを少なくとも構成糖とする低分子量の糖」である「低分子量HA」(特にHA 4)又はその薬学的に許容される塩は、神経障害(特に神経の外傷によるもの。特に脊髄損傷。)の処置に極めて有用であり、しかも安全性が高いことが示された。

産業上の利用の可能性

本発明処置剤は、神経障害、特に脊髄損傷や神経の外傷による神経障害に対して優れた効果を発揮し、しかも安全性が高いことから極めて有用である。

請求の範囲

1. グルクロン酸及び／若しくはN-アセチルグルコサミンを少なくとも構成糖とする低分子量の糖又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする、神経障害処置剤。
2. グルクロン酸及び／若しくはN-アセチルグルコサミンを少なくとも構成糖とする低分子量の糖が、低分子量ヒアルロン酸である、請求項1に記載の処置剤。
3. 低分子量ヒアルロン酸が、ヒアルロン酸2糖～ヒアルロン酸2500糖である、請求項2に記載の処置剤。
4. 低分子量ヒアルロン酸が、ヒアルロン酸2糖～ヒアルロン酸50糖である、請求項3に記載の処置剤。
5. 低分子量ヒアルロン酸が、ヒアルロン酸4糖である、請求項4に記載の処置剤。
6. 神経障害が、脊髄損傷又は神経の外傷によるものである、請求項1～5のいずれか1項に記載の処置剤。
7. グルクロン酸及び／若しくはN-アセチルグルコサミンを少なくとも構成糖とする低分子量の糖又はその薬学的に許容される塩の有効量を神経障害に罹患した動物に投与することを特徴とする、神経障害の処置方法。
8. 神経障害処置剤を製造するためのグルクロン酸及び／若しくはN-アセチルグルコサミンを少なくとも構成糖とする低分子量の糖又はその薬学的に許容される塩の使用。

1 / 13

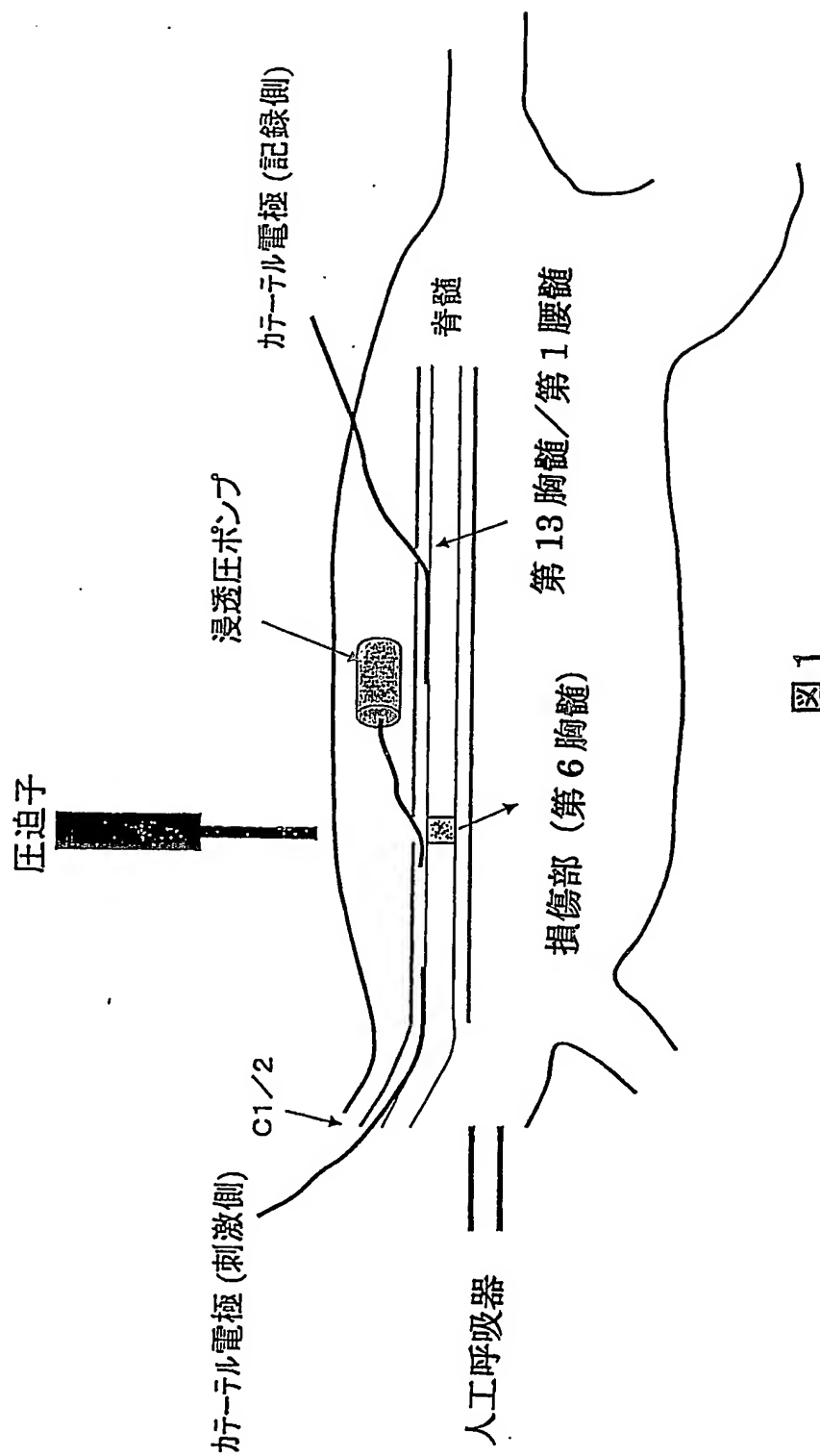


図1

2/13

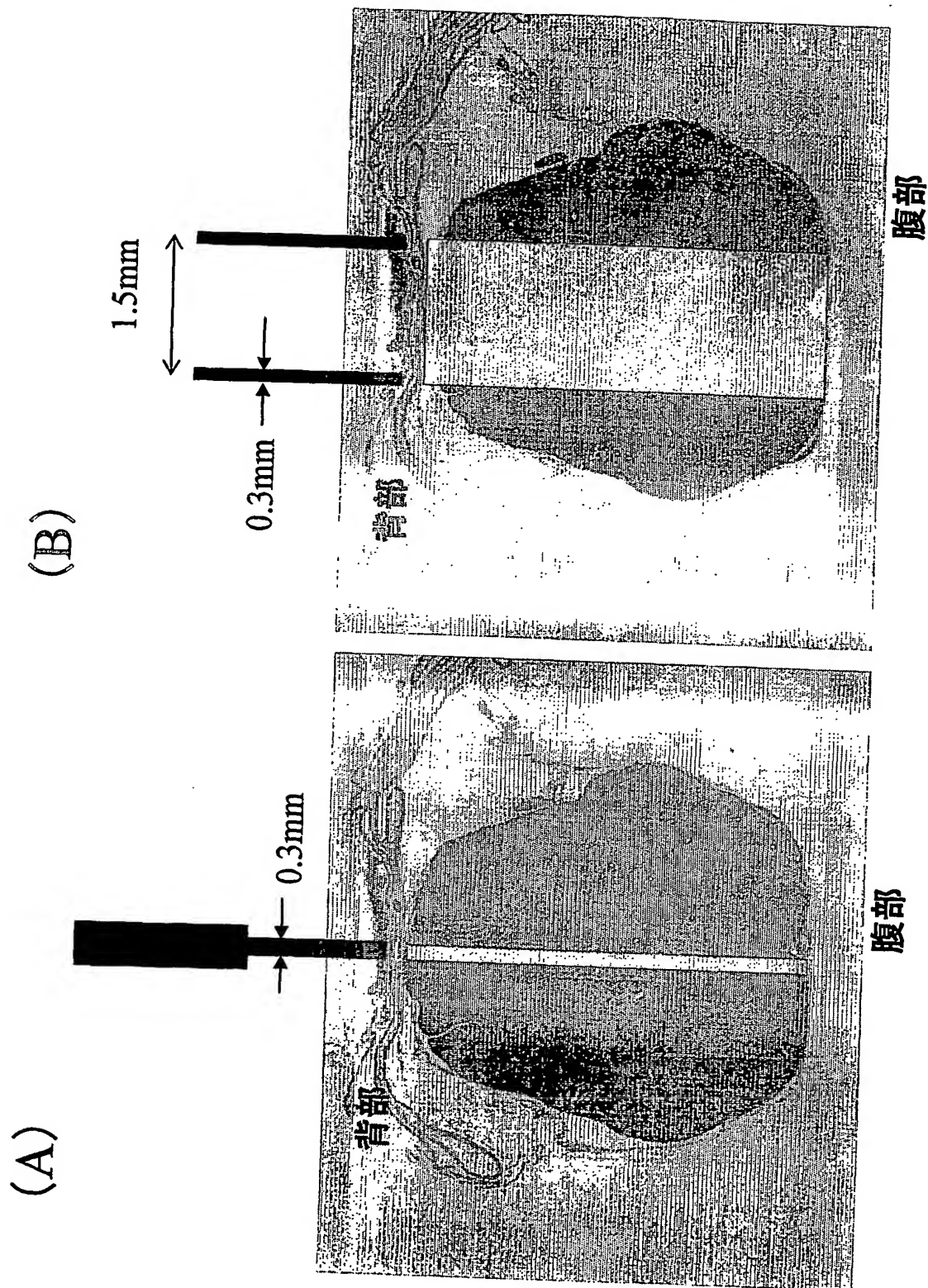


図2

3 / 1 3

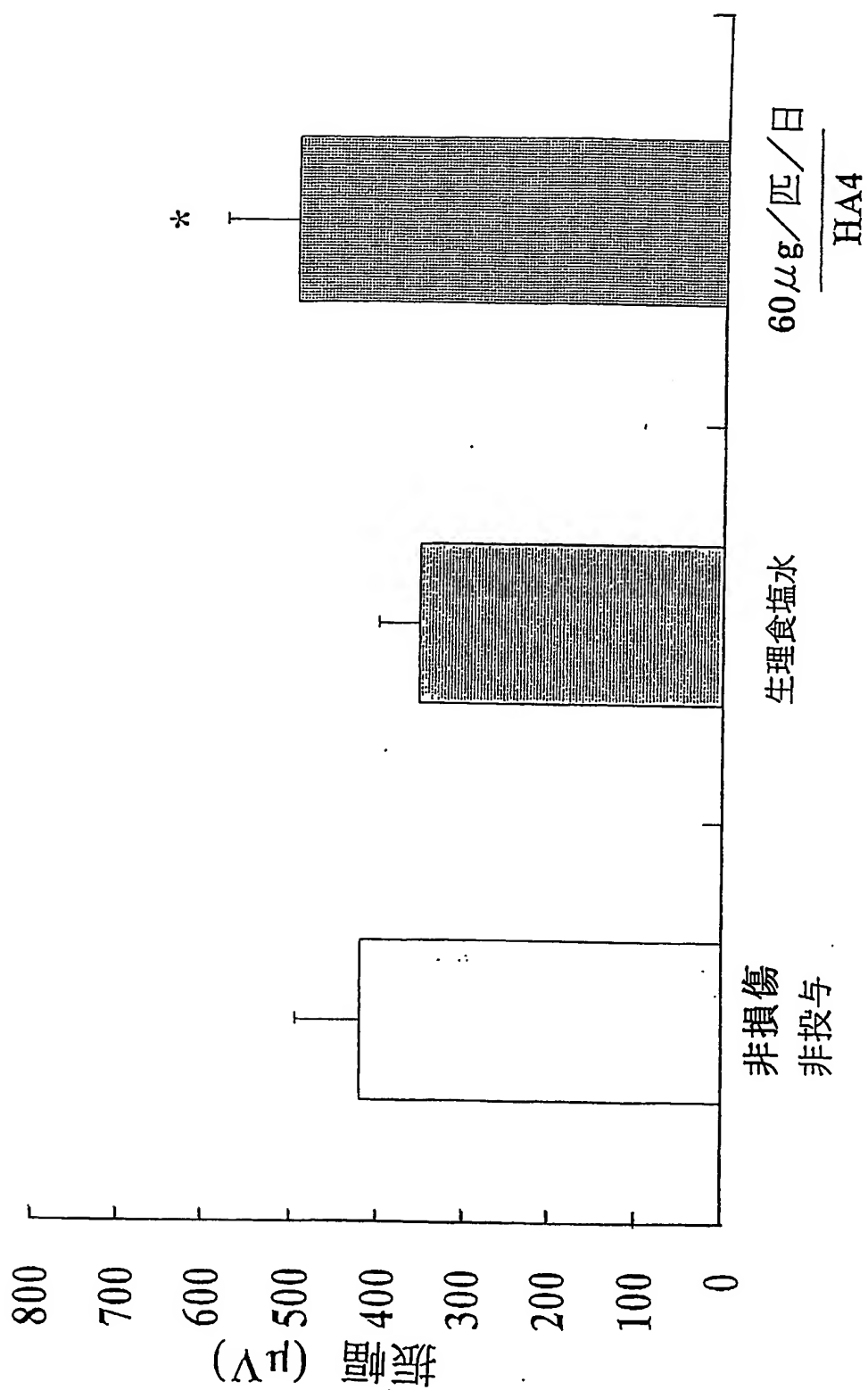


図3

4 / 1 3

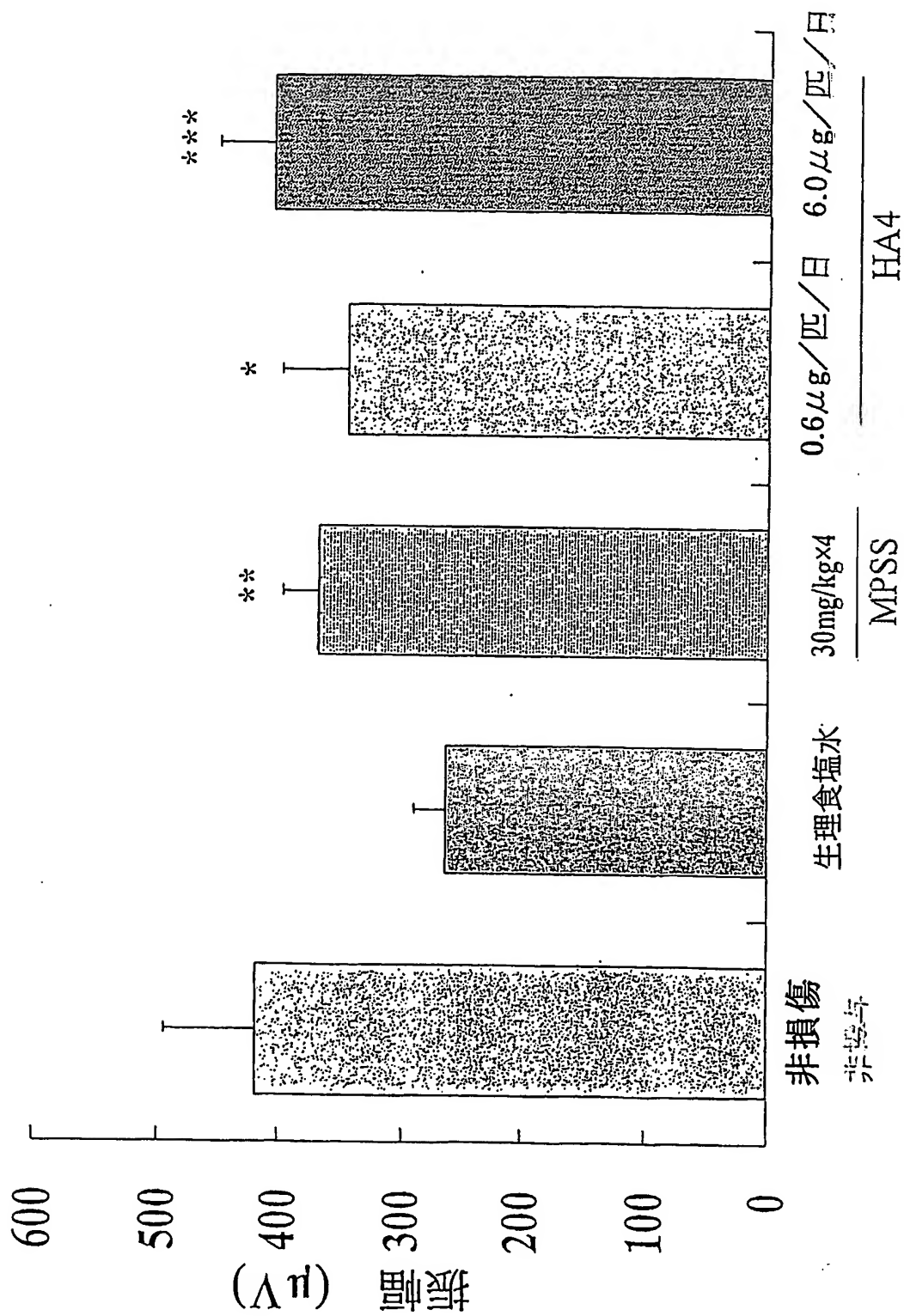


図4

5/13

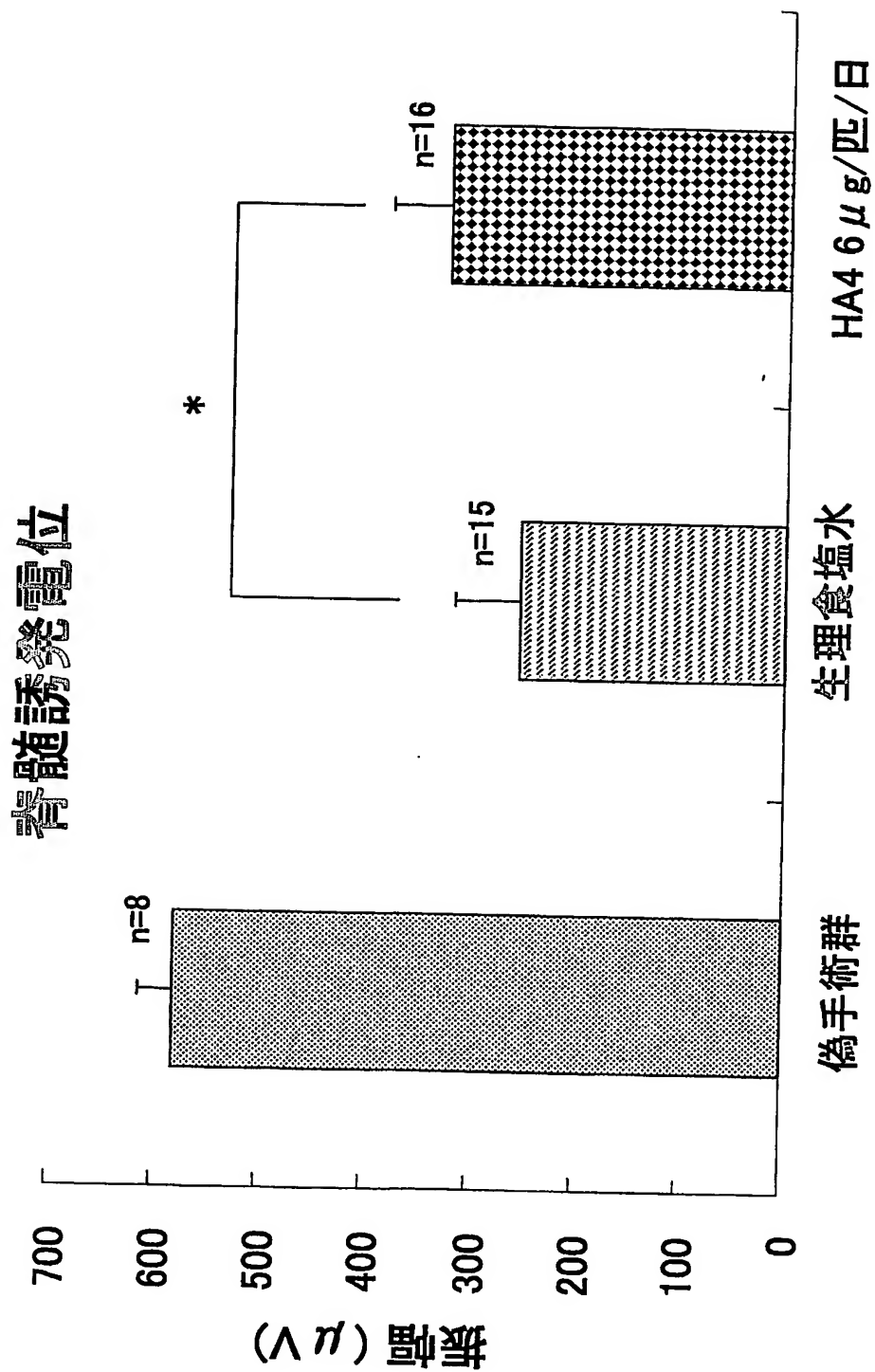


図 5

6/13

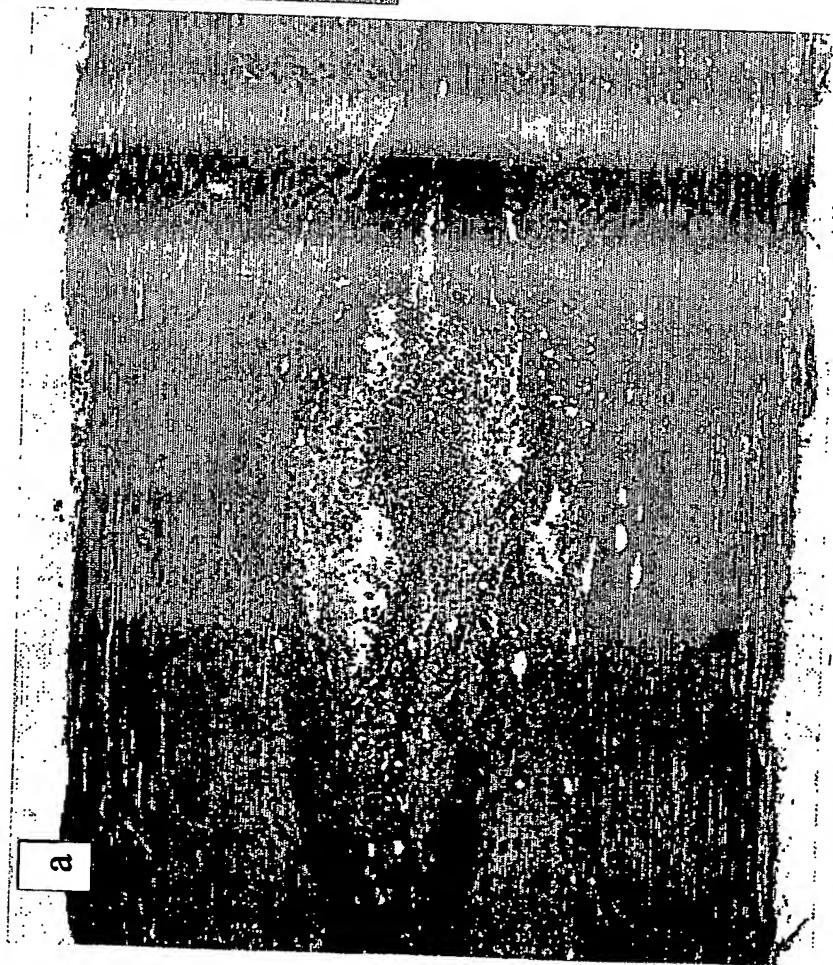
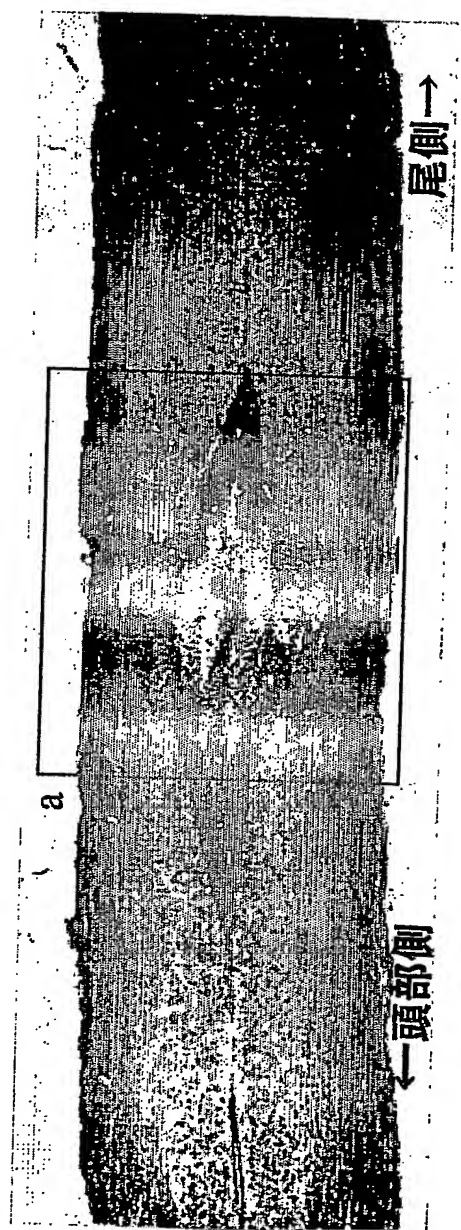


図6

7/13

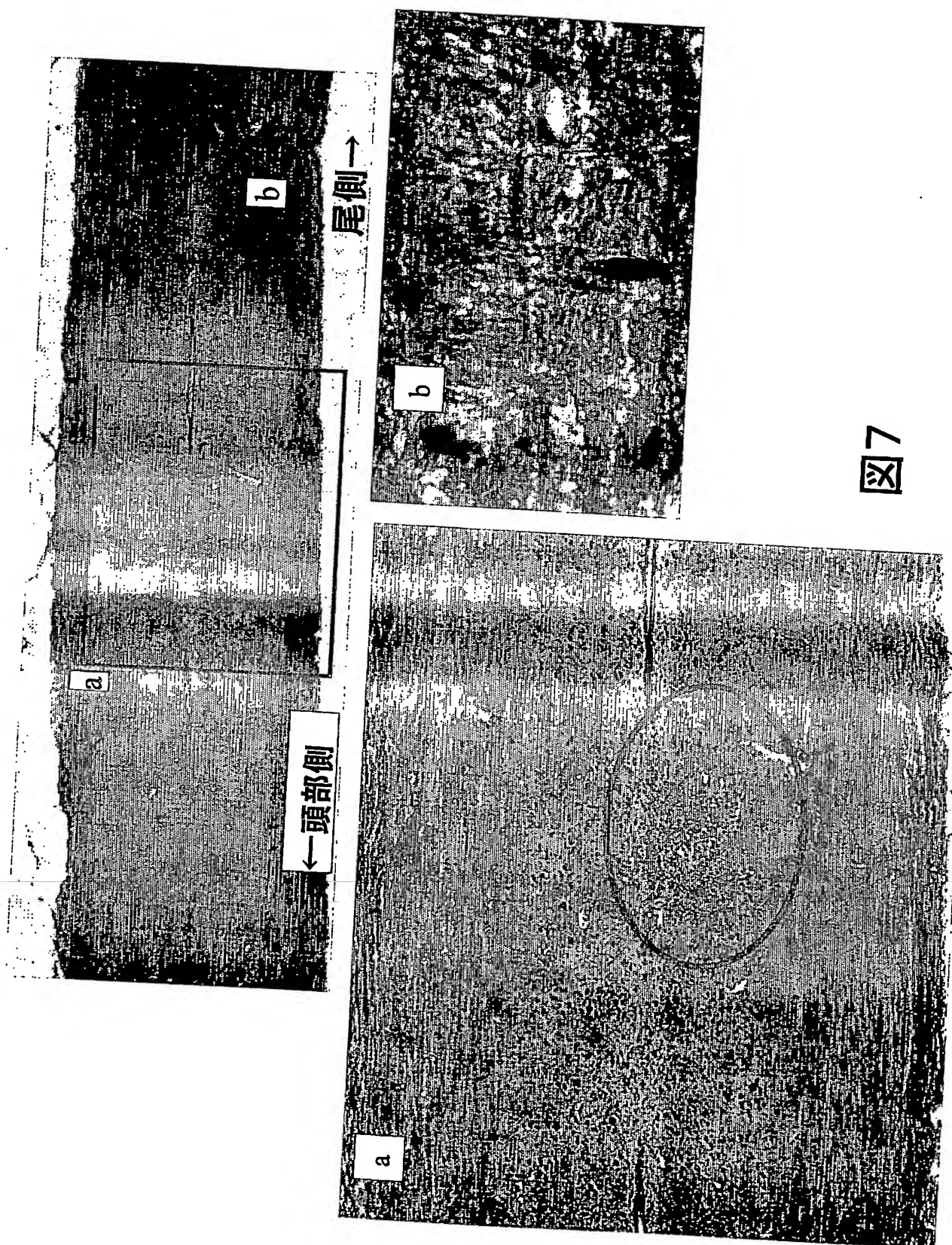


図7

8 / 13

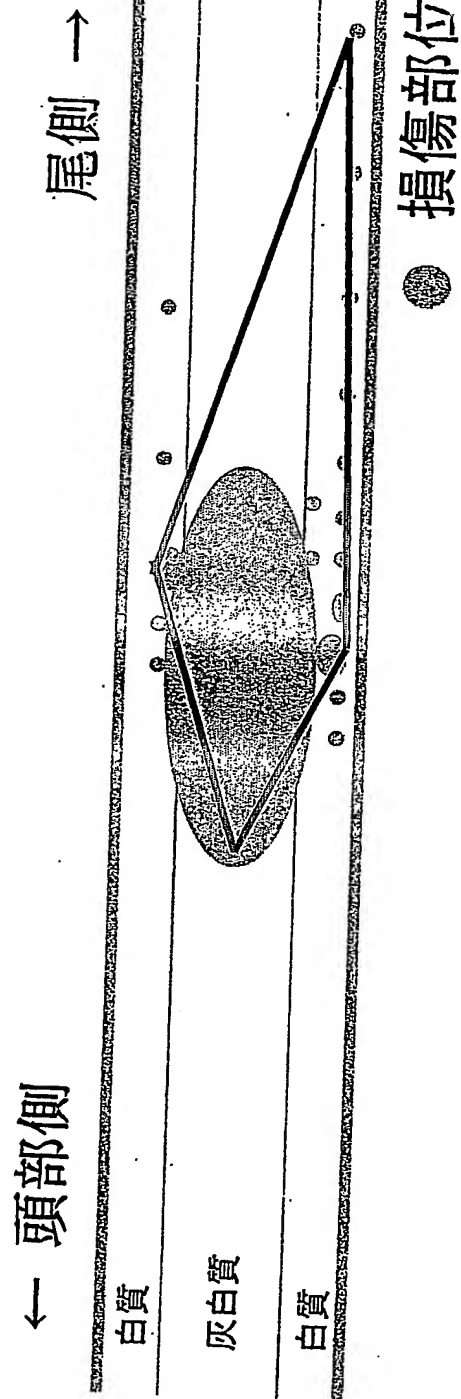
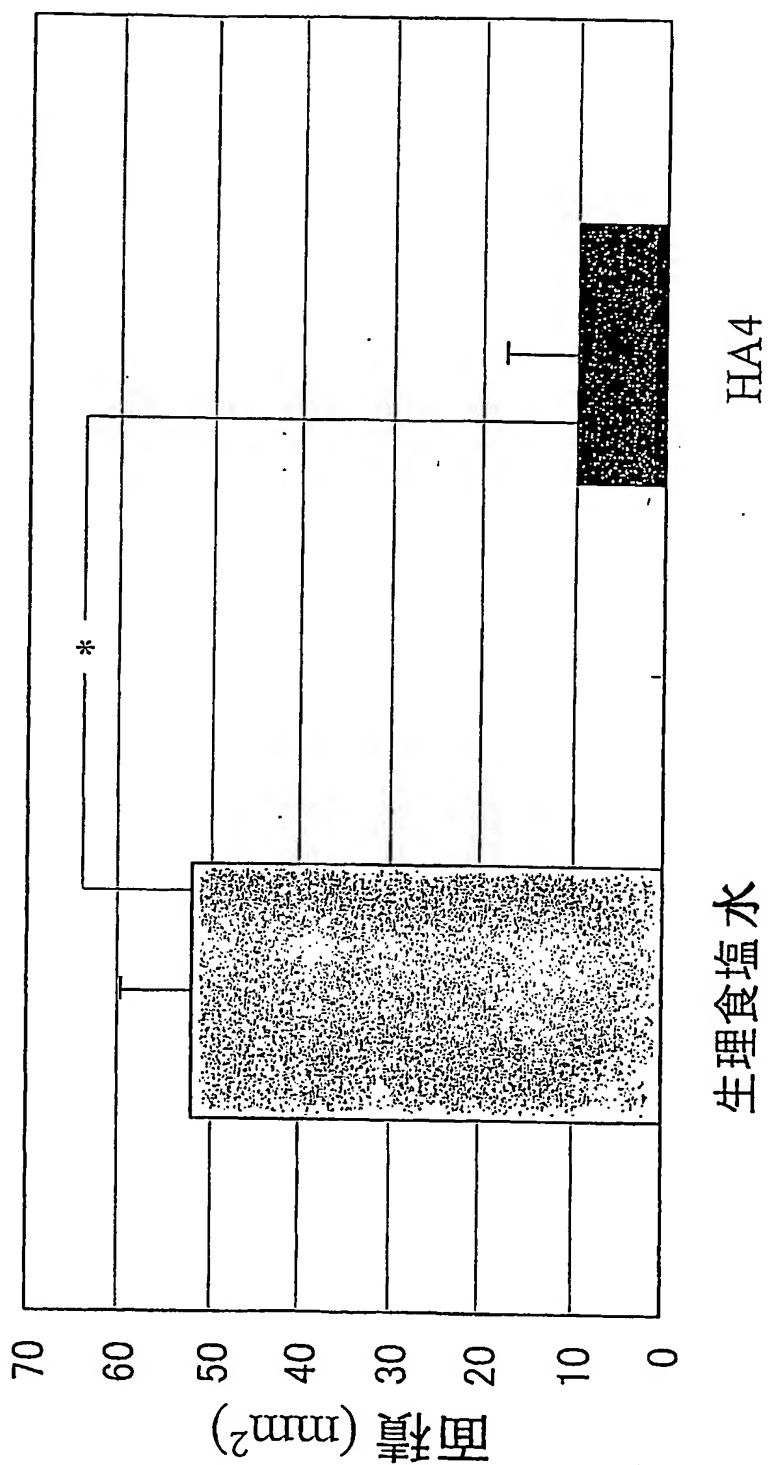


図 3

9 / 13



*: $P < 0.05$

図9

10 / 13



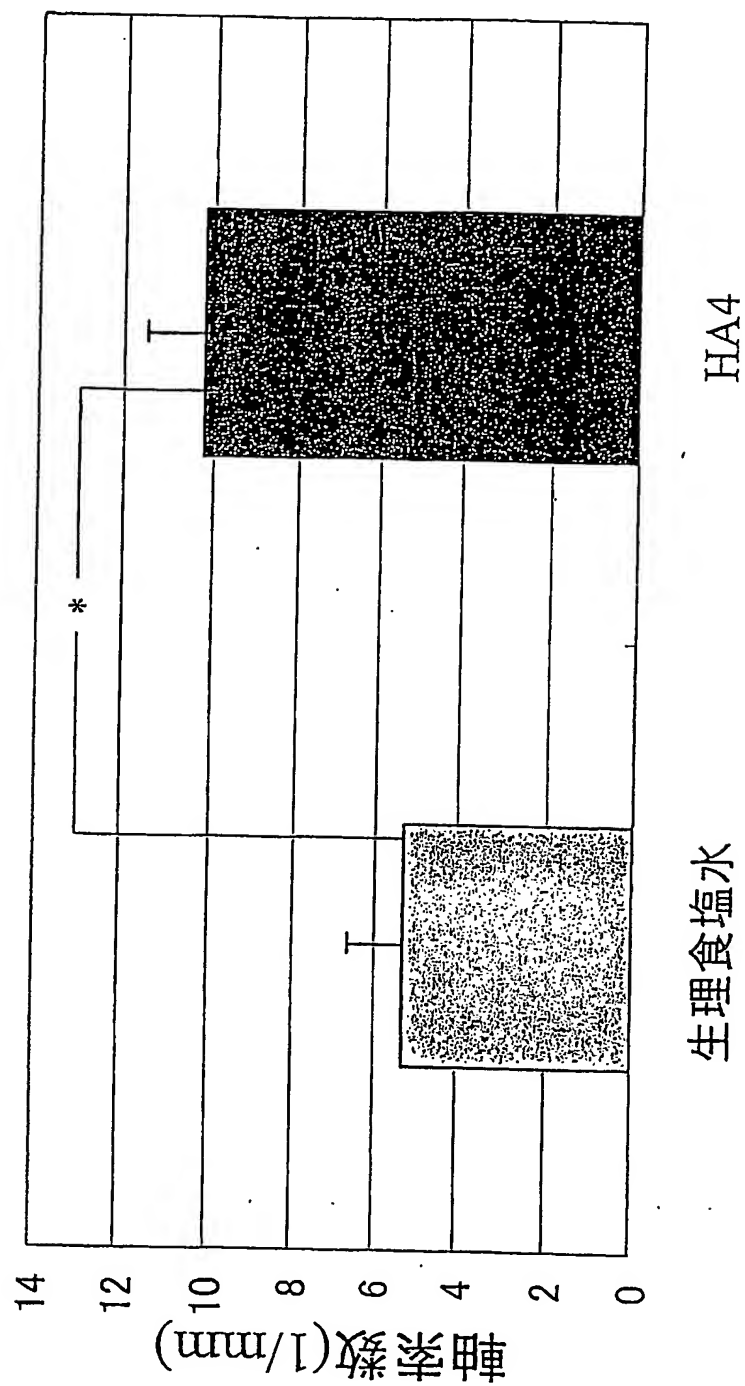
(A)



(B)

図10

11/13



*:P<0.05

図 11

12/13

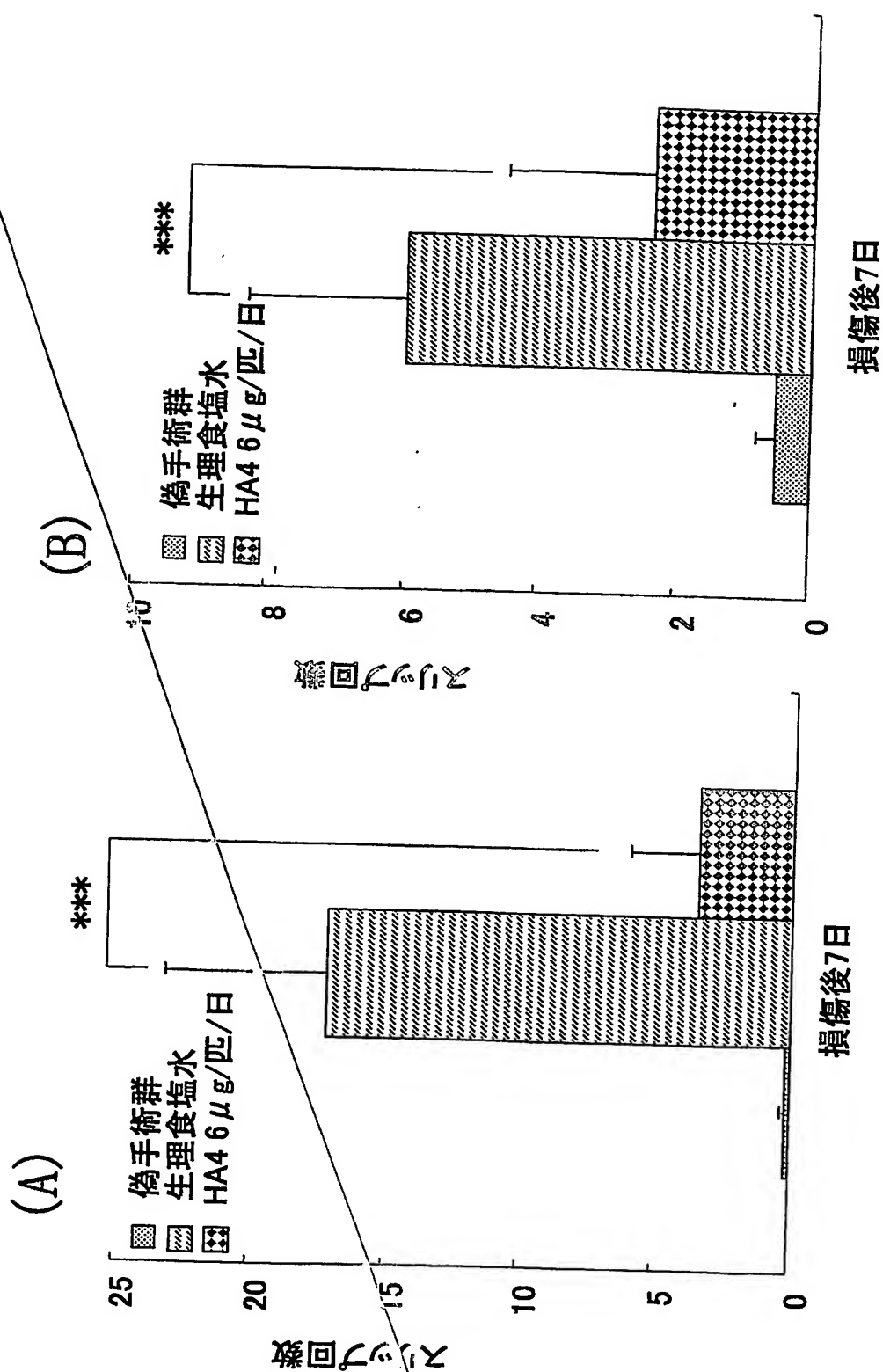
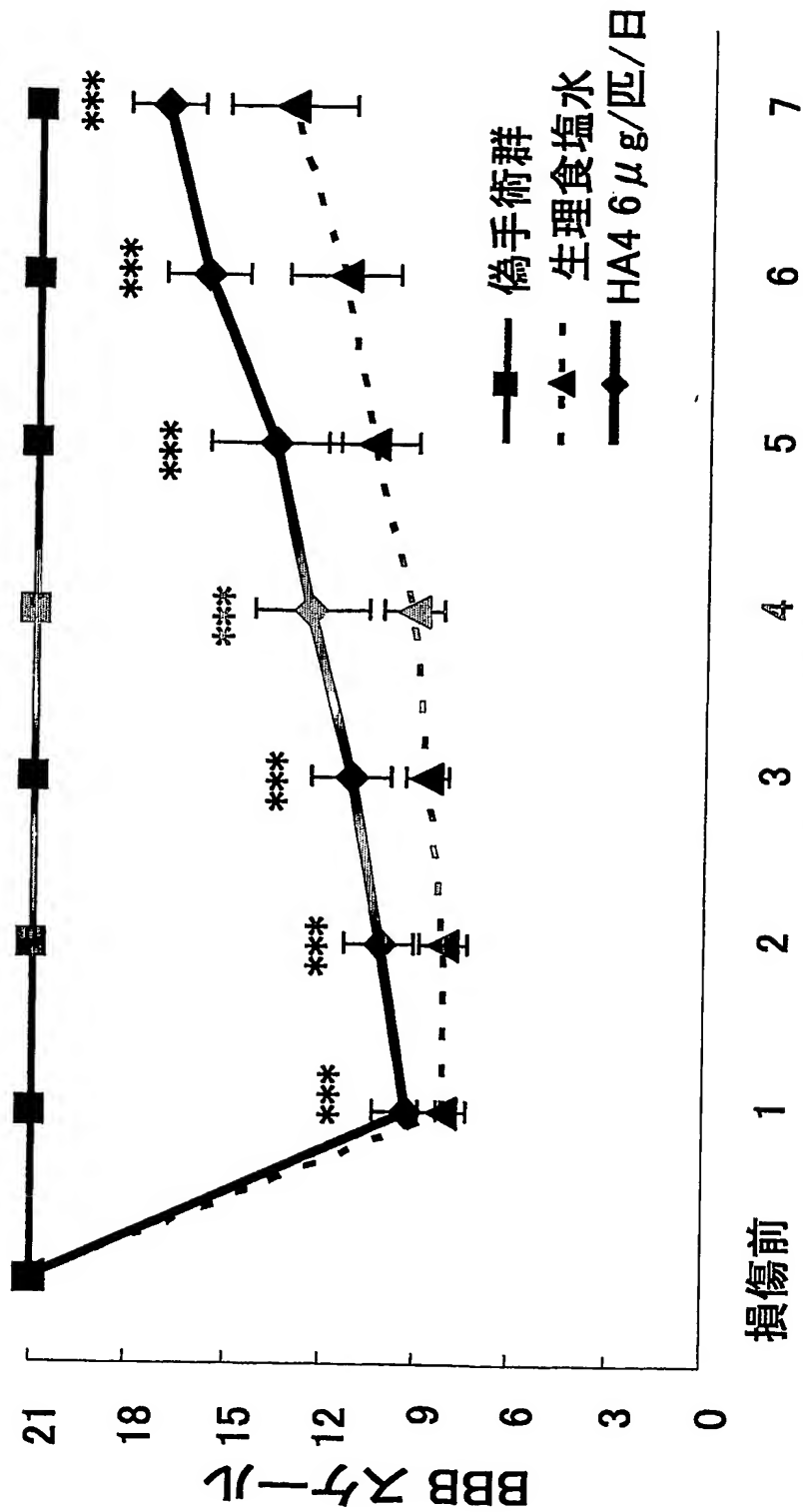


図12

13/13



損傷後の日数

図13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004240

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K31/70, C07H5/06, 7/033, C08B37/08, A61P25/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K31/70-31/7024, C07H5/06, 7/033, C08B37/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/04471 A1 (Seikagaku Corp.), 17 January, 2002 (17.01.02), Full text & EP 1300412 A1 & CA 2414211 A	1-6, 8
X	JP 9-227386 A (Seikagaku Corp.), 02 September, 1997 (02.09.97), Full text (Family: none)	1-6, 8
X	JP 11-310602 A (Seikagaku Corp.), 09 November, 1999 (09.11.99), Full text & WO 99/43714 A1 & EP 1059304 A1	1-6, 8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
19 May, 2004 (19.05.04)

Date of mailing of the international search report
01 June, 2004 (01.06.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004240

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 9-30979 A (Seikagaku Corp.), 04 February, 1997 (04.02.97), Full text (Family: none).	1-4, 6, 8
X	JP 6-157322 A (Crinos Industria Farmacobiologica S.p.A.), 03 June, 1994 (03.06.94), Full text & EP 582330 A1 & US 5605891 A	1-6, 8
X	WO 01/72762 A1 (AVENTIS PHARMA S.A.), 04 October, 2001 (04.10.01), Full text & EP 1272499 A1 & EP 1325030 A1 & CA 2403906 A & FR 2807043 A & WO 01/87064 A1	1-6, 8
X	WO 01/29055 A2 (AVENTIS PHARMA S.A.), 26 April, 2001 (26.04.01), Full text & EP 1226148 A1 & CA 2388369 A & FR 2800074 A & JP 2003-512385 A1	1, 6, 8
A	JP 2000-198738 A (Kuraray Co., Ltd.), 18 July, 2000 (18.07.00), Full text (Family: none)	1-6, 8
P,X	JP 2004-75618 A (Yaizu Suisan Kagaku Kogyo Kabushiki Kaisha), 11 March, 2004 (11.03.04), Full text (Family: none)	1, 8
P,A	JP 2003-119146 A (Seikagaku Corp.), 23 April, 2003 (23.04.03), Full text (Family: none)	1-6, 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004240

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 7
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
It pertains to method for treatment of the human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/70, C07H5/06, 7/033, C08B37/08, A61P25/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/70-31/7024, C07H5/06, 7/033, C08B37/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 02/04471 A1 (生化学工業株式会社) 2002. 01. 17, 全文 & EP 1300412 A1 & CA 2414211 A	1-6, 8
X	JP 9-227386 A (生化学工業株式会社) 1997. 09. 02, 全文 (ファミリーなし)	1-6, 8
X	JP 11-310602 A (生化学工業株式会社) 1999. 11. 09, 全文 & WO 99/43714 A1 & EP 1059304 A1	1, 6, 8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19. 05. 2004

国際調査報告の発送日

01. 6. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

關 政立

4 C

8619

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 9-30979 A (生化学工業株式会社) 1997. 02. 04, 全文 (ファミリーなし)	1-4, 6, 8
X	JP 6-157322 A (クリノス インドウストリア ファ ルマコビオロジカ エス. ピ. ア.) 1994. 06. 03, 全文 & EP 582330 A1 & US 5605891 A	1-6, 8
X	WO 01/72762 A1 (AVENTIS PHARMA S.A.) 2001. 10. 04, 全文 & EP 1272499 A1 & EP 1325030 A1 & CA 2403906 A & FR 2807043 A & WO 01/87064 A1	1-6, 8
X	WO 01/29055 A2 (AVENTIS PHARMA S.A.) 2001. 04. 26, 全文 & EP 1226148 A1 & CA 2388369 A & FR 2800074 A & JP 2003-512385 A1	1, 6, 8
A	JP 2000-198738 A (株式会社クラレ) 2000. 07. 18, 全文 (ファミリーなし)	1-6, 8
PX	JP 2004-75618 A (焼津水産化学工業株式会社) 2004. 03. 11, 全文 (ファミリーなし)	1, 8
PA	JP 2003-119146 A (生化学工業株式会社) 2003. 04. 23, 全文 (ファミリーなし)	1-6, 8

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 7 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

人の身体の治療による処置方法に関するものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.